

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-300889

(43)Date of publication of application : 05.12.1989

(51)Int.Cl.

C12N 1/20
// C12N 15/00

(21)Application number : 63-132000

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 30.05.1988

(72)Inventor : IKURA KOJI
SASAKI RYUZO
CHIBA HIDEO

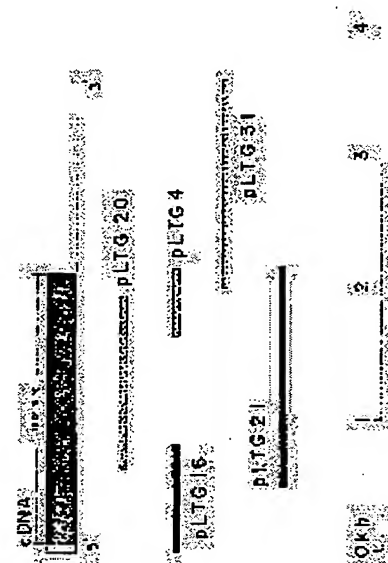
(54) TRANSFORMANT AND PRODUCTION OF MTGASE USING SAME

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A microorganism such as Escherichia coli transformed by a plasmid containing gene coding guinea pig liver transglutaminase (MTGase).

USE: For production of MTGase to modify nutrient value or physical properties by introducing various amino acids into food proteins so as to form covalent bond.

PREPARATION: For example, from clones from plural Escherichia coli containing the partially duplicate CDNA of MTGase, plasmid pLTG 16 and plasmid pLTG 21 are extracted and cut with a relevant restriction enzyme, and the resultant DNA fragments are fractionated by agarose electrophoresis followed by conjunction of the DNA fragments in the translational region coding MTGase using DNA ligase to produce a plasmid containing gene coding MTGase. Thence, this plasmid is incorporated into Escherichia coli to transform this Escherichia coli followed by culture of the resultant microorganisms, thus obtaining the objective recombinant MTGase.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

1935

[Date of extinction of right]

10 JUN 68
RECEIVED
U.S. AIR FORCE
WASHINGTON, D.C.

訂正有り

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-300889

⑬ Int.Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成1年(1989)12月5日
 C 12 N 1/20 G-8515-4B
 // C 12 N 15/00 A-8717-4B
 審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

⑮ 発明の名称 形質転換体及びこれを用いるMTGaseの製造法

⑯ 特 願 昭63-132000

⑰ 出 願 昭63(1988)5月30日

特許法第30条第1項適用 昭和63年4月2日 社団法人日本農芸化学会開催の「昭和63年度日本農芸化学会大会」において文書をもつて発表

⑱ 発 明 者 伊 倉 宏 司 京都府八幡市八幡山田26-1
 ⑲ 発 明 者 佐 々 木 隆 造 京都府京都市左京区田中東高原町14
 ⑳ 発 明 者 千 葉 英 雄 京都府宇治市広野町新成田100-131
 ㉑ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

明 細 書

1. 発明の名称

形質転換体及びこれを用いるMTGaseの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) モルモット肝トランスグルタミナーゼ(以下MTGaseと略す)をコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物。

(2) 微生物がエシェリヒア・コリである請求項(1)記載の微生物。

(3) 請求項(1)又は(2)項記載の微生物を培地中で培養して目的とするリコンビナントMTGaseを生産させ、該リコンビナントMTGaseを培地中から採取することを特徴とするリコンビナントMTGaseの製造法。

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明はMTGaseをコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物及び該微生物によるリコンビナントMTGaseの製造法に関する。

る。

<従来技術>

モルモット肝トランスグルタミナーゼ(Protein-glutamine:amino γ -glutamyltransferase,

EC2.3.2.13、以下TGaseと略する)はタンパク質の修飾酵素の一つであり、Ca²⁺依存性のアシル転移酵素である。基質としては、アシル供与体としてペプチド鎖中Gln残基の γ -カルボキシアミド基が、アシル受容体としてアミン化合物の第1級アミノ基やペプチド鎖中Lys残基の ϵ -アミノ基がそれぞれ反応する。

尚、反応機構は以下のとおりである。

$$\begin{array}{l} \text{反 应 概 括} \\ \sum \text{Gln} - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH}_2 + \text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_4 - \sum \text{Lys} \xrightarrow{\text{Ca}^{2+}} \sum (\text{CH}_2)_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - (\text{CH}_2)_4 - \sum + \text{NH}_2 \\ + \text{H}_2\text{O} \end{array}$$

- 496 -

特開平1-300889(3)

ードする遺伝子を挿入し、接続すればよい。このようにして得られた組み換えDNAを原核生物宿主に導入し、得られた形質転換微生物の中からMTGaseを生産する株を選べば良い。本発明において、組み換えDNAが導入される微生物宿主としてはエシェリヒア・コリ、バチルス・ズブチリス等を用いることができるが、好ましくはエシェリヒア・コリを用いるのが良い。

また、本発明に用いることができるエシェリヒア・コリ用ベクターとしてはEKタイププラスミドベクター（リラックス型）、EKタイププラスミドベクター（ストリンジェント型）、 λ gt10タイプファージベクター等々の種々のベクターを用いることができる。

またプロモーターとしてはtrpプロモーター、lacプロモーターを初めとするエシェリヒア・コリ中で機能するすべてのプロモーターが利用可能である。

組み換えDNAを用いた宿主細胞の形質転換には、通常よく用いられる次の方法がある。エシェリヒ

ア・コリの如き原核生物が宿主の場合、このDNAを取り込むことの出来るコンピテント細胞は対数増殖期における細胞を回収後、良く知られているCaCl₂法によって形質転換できる。形質転換反応液中にMgCl₂又はRbClを共存させれば形質転換効率は向上する。また宿主細胞のプロトプラスト調製後形質転換させることも可能である。

形質転換された微生物を培養する培地および培養方法は通常の培地、方法でよい。すなわち培地としては炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要に応じアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。

炭素源としてはグルコース、シュクロース等及びこれらを含有する澱粉加水分解物、糖蜜等が用いられる。窒素源としてアンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が使用できる。より好ましくはペプトン、トリプトン、肉エキス、酵母エキス等の天然素材なども使われる。

培養は好氣的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ行なえば良い。

培養菌体より、リコンビナントMTGaseを採取するには、通常以下のような方法で行えば良い。

即ち、培養菌体を冷却遠心機等で集菌した後、適当なバッファーに懸濁し、超音波あるいはダイノミルなどで菌体を破碎して抽出液を得る。この菌体抽出液を硫酸沈澱分画法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過法、抗体カラム法などを行ってリコンビナントMTGaseの精製極品が得られるわけである。

〔効果〕

本発明はモルモットの肝臓が供給源である為に①少量しかMTGaseを提供できない、②高価である、③精製操作が非常に煩雑である等の従来法の欠点を解消し得る画期的な方法である。換言すれば、本発明の方法を用いると、大量に、しかも、安く、更に、簡便にMTGaseを提供し得るのである。

このようにして得られたリコンビナントMTGaseは従来の天然型MTGaseと同様に、各種アミノ酸を食品蛋白質に共有結合的に導入することにより、栄養価や物性を改変することができる。また、本

酵素は食品以外の医薬品、化成品への応用も期待できる。

以下、本発明を実施例に従って説明する。

〔実施例1：発現プラスミドpMTG1の構築〕

本発明者等は既にMTGaseの部分重複cDNAのクローン5個を取得しており（第1図参）、またこれを基にDNA配列及びアミノ酸配列を決定している（第2図参）。

さて、まず第1図に示したプラスミドpMTG16を含有するエシェリヒア・コリMC1061（以下、E. coli MC1061とする）及びプラスミドpMTG21を含有するE. coli MC1061より以下の方法に従ってプラスミドpMTG16及びプラスミドpMTG21を抽出した。

即ち、培養液100mlを遠心分離により菌体のみ集め、50mMTri-HCl、pH7.5の5mlに懸濁し-80℃で凍結後、融解して次にリゾチム（最終濃度、2mg/ml）を加えて0℃で10分間静置し、さらにEDTA（最終濃度0.1M）を加え、0℃で10分間静置する。その後、Triton X

特開平1-300889(4)

-100 (最終濃度 0.1%) を加えて 0℃ で 60 分間静置する。ついで 30,000rpm、30 分間遠心分離し、その上清液を等量の水飽和フェノールで処理する。その水層をさらに等量のクロロホルムで処理し、その水層を抽出し、これに最終濃度 20 μg/μl となるように RNase を加え、37℃ で 60 分間インキュベートした。

その後 0.2 容の 5M NaCl と 1/3 容のポリエチレングリコールを加え、0℃ に 60 分間静置後、10,000rpm 20 分間、遠心分離により DNA 沈殿を回収する。

次にこの沈殿を 3.8 μl の水に溶解し、4 g の CsCl を加えて溶解後、10 μg/μl の EtBr の 200 μl を加えて 40,000rpm、16 時間、20℃ で超遠心分離を行う。

遠心終了後、プラスミド DNA 画分を抽出し、水飽和 n-ブタノールの 1~2 容で 4 回抽出操作を行って EtBr を除く。その後 H₂O 中で透析を行って CsCl を除去後、3M 酢酸ソーダ pH 5.6 の 1/10 容を加え、さらに 2 容の冷エタノールを加えて、

-20℃ で一晩静置する。このエタノール沈殿を遠心分離で集めて 80% エタノール水溶液で洗浄後、よく乾燥し、この沈殿物を 50 μl の 1mM EDTA を含む 10mM Tris-HCl, pH 7.5 に溶解しサンプルとした。

プラスミド pLTG16 及びプラスミド pLTG21 より MTCase 発現プラスミド pKTG1 を構築した (第 3 及び 4 図)。以下に、その詳細を示した。

i) プラスミド pLTG1621A の構築

(イ) さて、プラスミド pLTG16 を制限酵素 BsaI、HindIII で切断し、アガロースゲル電気泳動分離により大きい方の DNA 断片を回収した。尚第 3 図及び第 4 図において制限酵素で切断した DNA 断片の内、使用した DNA 断片は破線で示した。

(ロ) プラスミド pLTG21 を制限酵素 BsaI 及び HindIII で切断し、アガロースゲル電気泳動分離により、約 740bp の DNA 断片を回収した。

(ハ) 上記 (イ) 及び (ロ) で得た DNA 断片を DNA リガーゼを用いて連結させ、プラスミド pLTG

ス電気泳動分離により約 370bp の DNA 断片を回収した。

(ロ) 上記 (イ) で得たプラスミド pLTG1621B を制限酵素 BstEII 及び SalI で切断し、アガロース電気泳動分離により小さい方の DNA 断片 (約 1700bp) を回収した。

(ハ) プラスミド pUC118N (京大、ウィルス研究先生より分譲された) を制限酵素、NcoI 及び SalI で切断し、アガロース電気泳動分離により、大きい方の DNA 断片を回収した。

(ニ) 前記 (イ)、(ロ)、(ハ) で得た DNA 断片を DNA リガーゼにより連結させてプラスミド pUTG1 を構築した。

iv) プラスミド pKTG1 の構築

(イ) 上記 (iii) で得たプラスミド pUTG1 を制限酵素 NcoI 及び BstEII で切断し、アガロース電気泳動分離により約 370bp の DNA 断片を回収した。

(ロ) 上記 (iii) で得たプラスミド pUTG1 を制限酵素 BstEII 及び PstI で切断し、アガロース電

1621A を調製した。

ii) プラスミド pLTG1621B の構築

(イ) 上記 (i) で得たプラスミド pLTG1621A を制限酵素 SalI 及び HindIII で切断し、アガロース電気泳動分離により小さい DNA 断片 (約 1440bp) を回収した。

(ロ) プラスミド pLTG21 を制限酵素 HindIII 及び EcoRI で切断し、アガロース電気泳動分離により、小さい DNA 断片 (約 740bp) を回収した。

(ハ) プラスミド pUC9 (ファルマシア社製) を制限酵素 SalI 及び EcoRI で切断し、アガロース電気泳動分離により、大きな DNA 断片を回収した。

(ニ) 上記 (イ)、(ロ)、(ハ) で得た DNA 断片を DNA リガーゼで連結させて、プラスミド pLTG1621B を構築した。

iii) プラスミド pUTG1 の構築

(イ) 上記 (ii) で得たプラスミド pLTG1621B を制限酵素 NcoI 及び BstEII で切断し、アガロース

特開平1-300889(5)

電気泳動分離により小さい方のDNA断片(約1700 bp)を回収した。

(ハ) trc プロモーター (trp プロモーター及び lac プロモーターの融合したもの) 及びアンピシリン抵抗性を有するプラスミド pKK233-2 (ファルマシア社製) を制限酵素 Nco I 及び Pst I で切断し、アガロース電気泳動分離により、大きな DNA断片を回収した。

(ニ) 上記 (イ)、(ロ)、(ハ) で得た DNA断片を DNA リガーゼを用いて連結させて MTGase 発現プラスミド pXTG1 を構築した。

即ち、以上の操作を処することにより、2種類の重複する cDNA を有するプラスミド pLTG16 及び pLTG21 から MTGase をコードする全 DNA 配列 (開始コドン ATG から終止コドン TAA まで) を含有するプラスミド pXTG1 を構築したわけである。

(実施例2 大腸菌によるリコンビナント MTGase の生産)

i) 実施例1で作成した

プラスミド pXTG1 を保持するエシェリヒア・コ

リ JM103 株 (FERM P-10008) を $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリンを含む 2YT 培地 (1.6% バクトトリプトン、1.0% 酵母エキス、1.0% NaCl、pH 6.7) 1.0 mL 中で 37°C 、12時間培養した。

その後、誘導剤として、イソプロピルチオガラクトシド (IPTG) 0.2 mM を添加して5時間培養した。培養菌体を遠心分離により集菌し、 0.15 M KCl、 2 mM EDTA、 0.2 mM DTT を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した後、同じ緩衝液 30 mM に懸濁した。

この集菌菌体の一部をとり、1% SDS で溶菌し、その抽出液の1部を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。コントロールとして、モルモット肝より精製した MTGase 標品及びプラスミド pKK233-2 で形質転換されたエシェリヒア・コリ JM103 株を用いた。

この電気泳動したアクリルアミドゲルをニトロセルロース膜に写しとり、抗 MTGase 抗体で反応させた後にペーオキシダーゼを結合した2次抗体と反応させた。このウェスタンブロッティングの結果

果は第5図に示した。

これから分るようにプラスミド pXTG1 を含有するエシェリヒア・コリ JM103 株 (FERM P-10008) は菌体内にリコンビナント MTGase を生産していた。

ii) 上記 i) により菌体内に MTGase 蛋白が生産されていることを確認したので、このリコンビナント MTGase を以下の方法で菌体より抽出した。即ち、上述の懸濁液にソニック処理 (20キロサイクル、300秒) を行ない、抽出した。

この抽出液はトランスグルタミナーゼ活性を示した (第6図)。尚、コントロールとして、プラスミド pKK233-2 で形質転換したエシェリヒア・コリ JM103 株より同様の方法で抽出した抽出液を用いた。

第6図より分るように MTGase は Ca^{2+} 依存性酵素であるので、 Ca^{2+} が存在しないと、たとえ FERM P-10008 の抽出液であってもトランスグルタミナーゼ活性は示さない。

尚、トランスグルタミナーゼ活性の測定は以下の方法で行った。

$5 \text{ mg}/\text{mL}$ アセチル α_1 -カゼイン、 0.13 mM

(3H) プトレシン、 50 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、 5 mM CaCl₂、 10 mM DTT および抽出液を含む反応液 ($150 \mu\text{L}$) を 37°C でインキュベートし一定時間ごとに一定量の反応液 ($20 \mu\text{L}$) をペーパードиск上でスポットする。未反応の (3H) プトレシンをトリクロール酢酸で洗浄した後に、ペーパードиск上に固着したアセチル α_1 -カゼインに取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで測定した。

(L. Loraud et al.: Anal. Biochem., 50, 623-631 (1972)) に基本的にしたがっている。

(実施例3 モノクロナール抗体カラムによるリコンビナント MTGase の精製)

実施例2 ii) で得た抽出液 30 mM を抗 MTGase モノクロナール抗体カラム ($1.4 \text{ cm} \times 6 \text{ cm}$) にアブライした。

TBS バッファー (20 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、 0.15 M KCl、 0.2 mM DTT、 2 mM EDTA) 100 mM で洗浄した後、溶出バッファー (20 mM NaHCO₃

(7)

6

特開平1-300889(6)

-NaOH (pH 10.4)、0.4 mM DTT、2 mM EDTA、2 M KCl) 40 mM で目的とするリコンビナント MTGaseを溶出した。

溶出液を20 mM のカウンターバッファー(1 M トリス-塩酸 (pH 7.5)、0.4 mM DTT、2 mM EDTA) で中和した。

その後、限外濾過処理を行うことにより、精製リコンビナントMTGaseを得た。

確認の為に SDS-PAGEを行ったところ均一なバンドが得られた。この単離したリコンビナント MTGaseのトランスグルタミナーゼ活性を測定すると、その比活性は1690ユニット/mg $\times 10^4$ であった。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、MTGase cDNA の翻訳領域及び、各遺伝子領域を含むクローンを示す。

第2図はMTGaseのアミノ酸配列及びMTGaseをコードするDNA 配列を示す。

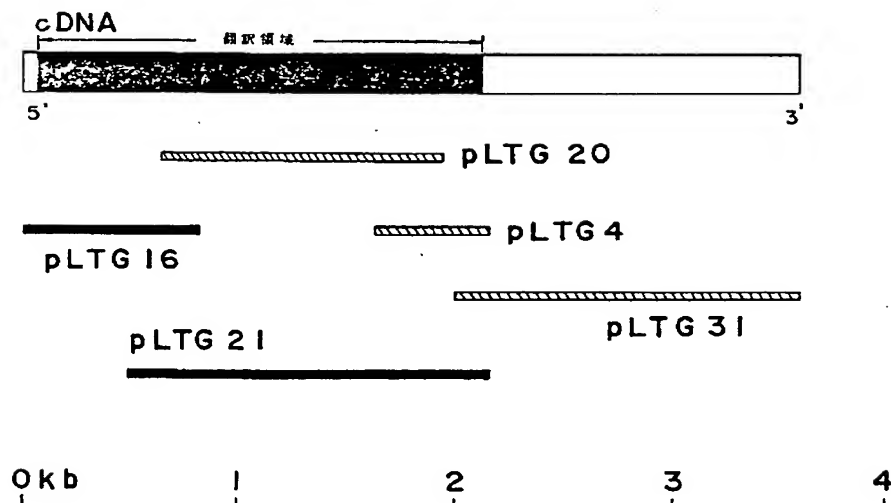
第3図はプラスミドpLTG1621Bの構築図を示す。

第4図はプラスミドpKTG1の構築図を示す。

第5図はプラスミドpKTG1により形質転換させたエシェリヒア・コリJM103株(FERM P-10008)のウェスタンブロッティングを示す。

第6図は培養した FERM P-10008 抽出液のトランスグルタミナーゼ活性を示す。

第 1 図

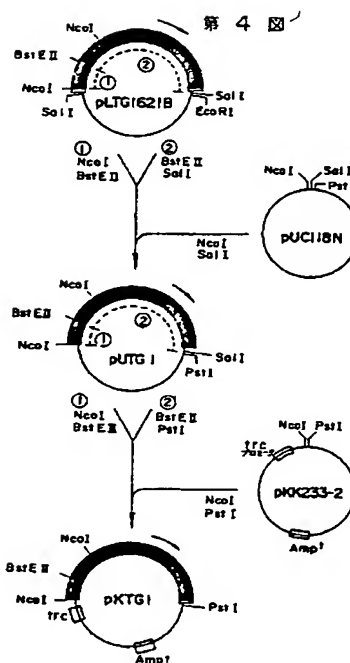
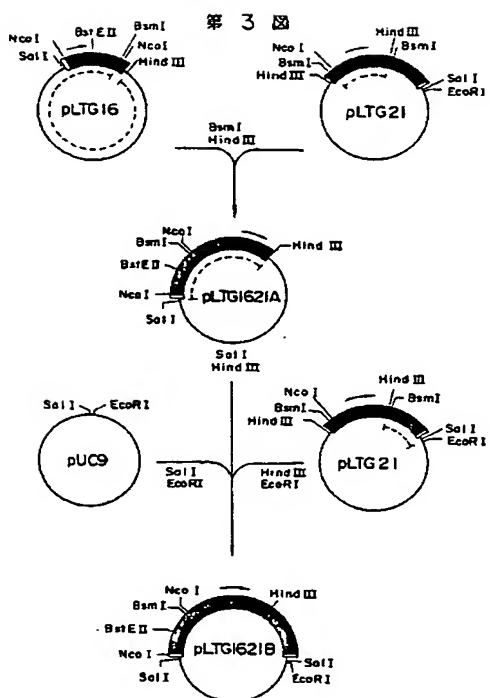


特開平1-300889(7)

第 2 圖

115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

特開平1-300889 (8)



第 6 図

